

Germinación de tres halófitos amenazados en Castilla-La Mancha en condiciones de estrés salino

J. M.^a Herranz*, P. Ferrandis y M. A. Copete

Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria. ETS de Ingenieros Agrónomos.
Universidad de Castilla-La Mancha. Campus Universitario, s/n. 02071 Albacete. España

Resumen

Se ha estudiado la influencia de la temperatura de incubación, iluminación y concentración salina sobre la germinación de *Arthrocnemum macrostachyum*, *Senecio auricula* y *Lepidium cardamine*. Las semillas se sometieron a la temperatura constante de 5°C y a las temperaturas fluctuantes de 15-4, 20-7, 25-10, 28-14 y 32-18°C, tanto con 12 h de fotoperiodo como en completa oscuridad. En los tratamientos con temperatura fluctuante, la temperatura más alta coincidió con la fase de luz. La concentración salina osciló entre 0 y 3% de NaCl y la duración de los ensayos fue de 30 días. Los porcentajes finales de germinación variaron de forma altamente significativa entre especies, así como en función de los factores temperatura, iluminación y salinidad, resultando también altamente significativas las interacciones entre los distintos factores. En las tres especies se ha superado el 68% de porcentaje final de germinación en semillas incubadas con agua destilada bajo condiciones de fotoperiodo, a cualquiera de las siguientes temperaturas fluctuantes: 20-7, 25-10, 28-14 y 32-18 °C. En todas las temperaturas los porcentajes y velocidades de germinación logrados con agua destilada disminuyeron progresivamente con el incremento de la concentración salina y sólo *A. macrostachyum* germinó de forma notable (57% a 20-7 °C) con una concentración salina de 2% de NaCl. Los efectos negativos del incremento de la salinidad sobre la germinación se manifestaron primero a las temperaturas más altas (28-14 y 32-18 °C). *A. macrostachyum* y *L. cardamine* han germinado mejor en condiciones de fotoperiodo que de oscuridad completa en la mayoría de las temperaturas ensayadas. Lo mismo ha sucedido con *S. auricula* a la temperatura constante de 5°C. La exposición de las semillas de *A. macrostachyum* y *S. auricula* a soluciones hipersalinas (4% NaCl) durante 6 meses determinó un incremento de la velocidad de germinación cuando fueron transferidas a agua destilada y, en el caso de la primera, un incremento del porcentaje final de germinación en semillas incubadas a 15-4 °C. La presencia de concentraciones salinas superiores al 2% de NaCl en el hábitat de las tres especies estudiadas puede impedir temporalmente su germinación hasta que no disminuya la salinidad como consecuencia de las precipitaciones.

Palabras clave: *Arthrocnemum macrostachyum*, *Lepidium cardamine*, luz, salinidad, *Senecio auricula*, temperatura, velocidad de germinación.

Abstract

Germination of three threatened halophytes in Castilla-La Mancha under salt-stress conditions

The influence of incubation temperature, light, and salinity on seed germination of *Arthrocnemum macrostachyum*, *Senecio auricula*, and *Lepidium cardamine* was studied. Seeds were incubated at constant temperature of 5°C and fluctuating temperatures of 15-4, 20-7, 25-10, 28-14 y 32-18°C, both at 12 h-photoperiod and darkness. In fluctuating-temperature treatments, the highest temperature was programmed to coincide with the light phase. Salt concentration ranged from 0 to 3% NaCl. Seed treatments lasted 30 days. Final germination percentages showed highly significant variations among species. Main effects of temperature, light, and salinity, and interactions of the three factors were highly significant on that parameter as well. Final germination percentage exceeded 68% in all species when seeds were incubated at 20-7°C, 25-10°C, 28-14°C, and 32-18°C with photoperiod and distilled water. Both percentage and velocity of germination decreased with salt concentration at all temperatures. At 2% NaCl concentration, only *A. macrostachyum* showed relevant germination percentage (57% at 20-7°C). Negative correlation between salinity and germination were first manifested at higher temperatures (28-14°C and 32-18°C). For most temperatures, *A. macrostachyum* and *L. cardamine* seeds reached higher final germination when incubated with photoperiod than in darkness. In *S. auricula*, however, it was only true for 5°C. In *A. macrostachyum* and *S. auricula*, germination velocity

* Autor para la correspondencia: jose.herranz@uclm.es

Recibido: 01-09-03; Aceptado: 06-04-04.

increased when seeds were transferred from hipper-saline solution (4% NaCl) during 6 months to distilled water. That change in salinity conditions also increased final germination of *A. macrostachyum* seeds when incubated at 15-4°C. The existence of salt concentrations over 2% NaCl in the natural habitat of the three species studied, may transitorily prevent germination until rainfall reduces salinity in the soil.

Key words: *Arthrocnemum macrostachyum*, *Lepidium cardamine*, light, salinity, *Senecio auricula*, temperature, velocity of germination.

Introducción

El conocimiento de la influencia de los factores ambientales sobre la germinación resulta de gran utilidad para poder afrontar con garantías de éxito la conservación y manejo de endemismos vegetales amenazados (Lentz y Johnson, 1998; Herranz *et al.*, 2002). Asimismo, es conocido que una de las etapas más críticas en el ciclo de vida de los halófitos es el periodo de germinación y establecimiento, siendo la respuesta germinativa en condiciones de estrés salino determinante del éxito de muchas poblaciones de plantas características de saladares (Keiffer y Ungar, 1997). Los trabajos realizados por Ungar (1978), Woodell (1985), Khan y Ungar (1997), Houle *et al.* (2001) y Khan y Gulzar (2003) han puesto de manifiesto que la mayoría de las especies halófitas germinan mejor en agua dulce que en agua salada, que niveles de salinidad por encima de los límites de tolerancia de una especie pueden retrasar la germinación o producir una completa inhibición de la misma, así como que las semillas de los halófitos pueden tolerar durante largos periodos la exposición a soluciones hipersalinas y luego germinar en un gran porcentaje al ser transferidas a agua destilada o cuando la salinidad del sustrato se reduce considerablemente. Debido a ello, las semillas de muchas especies halófitas suelen germinar a finales de invierno o principios de primavera, época en la que, en zonas con lluvias invernales que laven el suelo, los niveles de salinidad de éste son más reducidos (Keiffer y Ungar, 1997), determinando que la fase de establecimiento de plántulas se produzca antes del periodo de mayor estrés salino (Poljakoff-Mayber *et al.*, 1994; Ungar, 1996), que suele ser el verano en ambientes mediterráneos. Otra consecuencia de la inhibición de la germinación por las condiciones hipersalinas es la facilitación del establecimiento de bancos edáficos de semillas de especies tolerantes a dichas condiciones (Ungar, 1982; Badger y Ungar, 1994).

Dado que la respuesta germinativa de los halófitos en condiciones de estrés salino es muy variable, con grandes diferencias de comportamiento de unas espe-

cies a otras, los estudios encaminados a conocer la misma son de gran interés (Woodell, 1985; Badger y Ungar, 1989; Khan y Gulzar, 2003). El conocimiento de dicha ecología germinativa es muy valioso para una correcta gestión de los saladares, ecosistemas que se hallan muy amenazados por la presión antrópica, razón por la que han sido incluidos en el Anexo I de la Directiva de Hábitats de la Unión Europea (92/43/CEE) como hábitats prioritarios para la conservación. En Castilla-La Mancha, la mayoría de los saladares se encuentran bordeando complejos lagunares de aguas salobres (Alcázar de San Juan, Manjavacas, El Hito, Pedro Muñoz, Salicor) y han sido ya protegidos con la figura de reserva natural por la administración regional. Con este estudio se pretende aportar una contribución a la gestión de estos ecosistemas tan interesantes por la rica biodiversidad que albergan.

El presente trabajo analiza la influencia de la temperatura, iluminación y salinidad sobre la germinación de 3 halófitos amenazados en Castilla-La Mancha (Decretos 33/1998, de 5 de mayo, y 200/2001, de 6 de noviembre, por los que se crea y modifica el Catálogo Regional de Especies Amenazadas): *Arthrocnemum macrostachyum* (Moric.) Moris (Chenopodiaceae, «de interés especial»); *Senecio auricula* Bourgeau ex Cosson subsp. *auricula* (Compositae, «vulnerable») y *Lepidium cardamine* L. (Cruciferae, «en peligro de extinción»). La primera especie es un fanerófito de distribución mediterránea, la segunda un hemicriptófito iberonorteafricano y la tercera un endemismo ibérico que se comporta como terófito o hemicriptófito. *S. auricula* figura también con la misma categoría de amenaza en la Lista Roja de la Flora Vascular Española (VV.AA., 2000) y *L. cardamine* en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (Real Decreto 439/1990, de 30 de marzo). La importancia de la interacción entre temperatura, iluminación y salinidad sobre la germinación de halófitos ha sido puesta de manifiesto en varios estudios previos (De Villiers *et al.*, 1994; Khan y Ungar 1997; Khan y Gulzar, 2003).

En concreto, los objetivos del estudio fueron analizar la respuesta germinativa de las 3 especies indica-

das: 1) bajo diferentes condiciones de temperatura, iluminación y dosis de salinidad, 2) tras la exposición durante periodos de tiempo de 1 y 6 meses a concentraciones hipersalinas y posterior transferencia a agua destilada.

Metodología

Material vegetal

Tanto *S. auricula* como *A. macrostachyum* presentan una de sus principales poblaciones en Castilla-La Mancha en el saladar de Cordovilla (Tobarra, Albacete), donde fueron recogidas las semillas de ambos táxones el 15-05-2001 y 06-10-2001, respectivamente. *S. auricula* forma parte de albardinales salinos, adscribibles a la alianza *Lygeo sparti-Limonion angustibracteati*, característicos de los enclaves elevados del saladar no sometidos a hidromorfia temporal. *A. macrostachyum* es elemento integrante de los matorrales halófilos crasicaules presentes en las zonas deprimidas del saladar con encharcamiento estacional. *L. cardamine* se halla disperso en albardinales de la alianza *Lygeo sparti-Lepidion cardamine* (Rivas-Martínez *et al.*, 2002). Sus semillas fueron recogidas en el saladar de los alrededores de El Pedernoso (Cuenca) el 17-07-2001. Todas las semillas se almacenaron en sobres de papel en condiciones de laboratorio (temperatura de 18-20 °C y humedad relativa de 50-60%) hasta que fueron requeridas para la realización de los ensayos a principios de diciembre de 2001.

Efecto de la temperatura, iluminación y salinidad sobre la germinación

Los ensayos encaminados a analizar la respuesta germinativa a dosis salinas crecientes se realizaron del 1 al 30 de diciembre de 2001. Para cada especie, un lote de semillas utilizado como control se incubó en agua destilada. Asimismo, se prepararon otros lotes que se incubaron a concentraciones salinas de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 y 3% de NaCl, muy similares a las utilizadas por Keiffer y Ungar (1997), y Khan y Gulzar (2003). La concentración más alta utilizada se aproxima a la habitual del agua marina (NaCl, 3,5-4%).

En todos los casos las temperaturas de incubación fueron: 5, 15-4, 20-7, 25-10, 28-14 y 32-18 °C, tanto con 12 horas de fotoperiodo como en completa oscu-

ridad, resultando así 12 tratamientos por especie y concentración salina. En los tratamientos con fotoperiodo y temperatura fluctuante, la temperatura más alta se hizo coincidir con la fase de luz y la más baja con la de oscuridad. Con las temperaturas de incubación utilizadas en este estudio se ha pretendido lograr una aproximación ecológica a las condiciones naturales existentes en cotas altitudinales medias del interior de la Península (Elías y Ruiz, 1981), donde se han recogido las semillas, a lo largo del año: la temperatura constante de 5°C se aproxima a la temperatura media de los meses invernales (diciembre, enero y febrero); 15-4, 20-7, 25-10, 28-14 y 32-18°C se aproximan a la media de las temperaturas máximas-media de las temperaturas mínimas de los meses de noviembre y marzo, octubre y abril, septiembre y mayo, agosto y junio, y julio, respectivamente. Las temperaturas fluctuantes indicadas son similares a las empleadas por otros autores en estudios parecidos (Khan y Ungar, 1997; Khan y Gulzar, 2003) y se hallan también dentro de los rangos recomendados por las normas ISTA (1985). Las cámaras de germinación empleadas («Climas», modelo AGP-160) van provistas de dos tubos fluorescentes de 18 W con luz blanca, tipo luz día, que emiten mayor proporción de radiaciones dentro de la región roja (400-700 nm) del espectro lumínico que en la rojo-lejano (> 730 nm) y suministran una iluminancia de 1100 luxes, que se halla dentro del rango comprendido entre 750-1250 luxes aconsejado por las normas ISTA (1985).

Para cada tratamiento se utilizaron 100 semillas distribuidas en 4 réplicas de 25 semillas cada una, que se colocaron en placas Petri de 9 cm de diámetro sobre 2 hojas de papel de filtro. Para los tratamientos en condiciones de completa oscuridad, las placas se revistieron totalmente con 2 hojas de papel de aluminio. El conteo y eliminación de las semillas germinadas (radículas emergidas más de 1 mm) se efectuó cada 2-3 días en los ensayos con fotoperiodo. En las placas incubadas en condiciones de oscuridad, se realizó un único conteo al final del ensayo (30 días). La respuesta germinativa se evaluó por los parámetros: porcentaje final de germinación acumulado y velocidad de germinación medida por el índice t_{50} , que se define como el tiempo preciso para lograr la mitad del porcentaje final de germinación (Thanos y Georghiou, 1988). El índice t_{50} sólo se evaluó en las placas incubadas en condiciones de fotoperiodo cuya germinación acumulada superó el 8%, ya que valores inferiores se consideraron poco representativos.

Efecto de la exposición a soluciones hipersalinas

Para evaluar el efecto sobre la germinación de la exposición temporal de las semillas a soluciones hipersalinas, fenómeno habitual en hábitat salobres (Woodell, 1985; Khan y Ungar, 2001; Houle *et al.*, 2001), se ha seguido una metodología similar a la utilizada por Keiffer y Ungar (1997). Para cada especie se prepararon 4 lotes de semillas, 2 de ellos se expusieron a concentraciones salinas del 4 y 8% de NaCl desde el 1 de diciembre de 2001 hasta el 30 de mayo de 2002 y los otros 2 a las mismas concentraciones del 1 al 30 de mayo de 2002. La exposición a las concentraciones salinas indicadas se realizó colocando las semillas en placas Petri sobre 3 hojas de papel de filtro que se mantuvieron saturadas con la solución correspondiente, sellando las placas con para-film para reducir la evaporación de agua, y depositándolas en la cámara de 5 °C, temperatura que, en las concentraciones hipersalinas señaladas, previene la germinación durante esta fase del ensayo (Keiffer y Ungar, 1997). Las placas Petri no fueron recubiertas con papel de aluminio, quedando las semillas expuestas a los ciclos de iluminación-oscuridad de la cámara. El 1 de junio de 2002 se lavaron las semillas durante 30 minutos con agua corriente y se incubaron en agua destilada durante 30 días a 5, 20-7 y 28-14 °C con 12 horas de fotoperiodo y condiciones análogas a las descritas anteriormente. Los lotes de semillas tratados de esta forma tenían la misma edad para cada especie, descartando así que las diferencias en capacidad germinativa estuvieran influenciadas por la edad (Baskin y Baskin, 1998; Schütz *et al.*, 2002), difiriendo los lotes entre ellos por la concentración salina a la que habían sido expuestos y por el tiempo de exposición. En *A. macrostachyum* la temperatura de 5 °C se sustituyó por 15-4 °C, al mostrarse nula la germinación a la primera temperatura en los ensayos previos realizados. Asimismo, para cada especie se realizaron nuevos ensayos control, a las temperaturas indicadas anteriormente, con semillas almacenadas en seco hasta el 1 de junio de 2002.

Análisis estadístico

La evaluación del efecto de los diferentes factores considerados en el estudio sobre el porcentaje final y velocidad de germinación se realizó mediante análisis de la varianza. En el estudio del efecto de la tempera-

tura, iluminación y salinidad sobre la germinación, el porcentaje final de germinación se comparó mediante un ANOVA multifactorial, que incluía los siguientes factores: especie (3 niveles), temperatura de incubación (6 niveles), luz (2 niveles) y concentración salina (5 niveles). Los casos responsables de efectos principales significativos se detectaron mediante una prueba múltiple de Tukey. Los casos responsables de significación en las interacciones se exploraron mediante la comparación de los límites de confianza. Previamente a la realización del análisis, se comprobaron la homogeneidad de varianza (prueba de David) y la normalidad (prueba de Cochran) de los datos. Los valores de germinación, en porcentaje, se sometieron a una transformación de tipo arco-seno para su inclusión en el análisis. La velocidad de germinación, expresada mediante el parámetro t_{50} , se comparó entre aquellos tratamientos en los que el porcentaje final de germinación fue superior o igual al 8%. Puesto que los tratamientos analizados difirieron según la especie de la que se tratara, las variaciones en dicho parámetro se evaluaron por separado para cada especie mediante un ANOVA simple, incluyendo como factor el tratamiento (concentración salina \times temperatura; la luz, al no tener datos de velocidad de germinación en oscuridad, no se consideró). Los casos responsables de diferencias significativas se detectaron mediante una prueba múltiple de Tukey (1949).

El efecto de las concentraciones hipersalinas sobre la germinación se evaluó en cada especie por separado, al diferir entre ellas las temperaturas de incubación. En los tres casos, los cambios en la germinación final y en el parámetro t_{50} se evaluaron mediante un ANOVA bifactorial, siendo los factores el tratamiento (concentración de sal \times tiempo de exposición a la concentración hipersalina; 5 niveles incluyendo el control) y la temperatura de incubación (3 niveles). Otras características del análisis fueron exactamente iguales a las del ANOVA multifactorial usado en el estudio del efecto de la temperatura, iluminación y salinidad sobre la germinación, expuestas en el párrafo anterior.

Resultados

Efecto de la temperatura, iluminación y salinidad sobre la germinación

La Tabla 1 muestra los valores obtenidos en el ANOVA multifactorial al que se sometió la germinación fi-

Tabla 1. Efecto de la temperatura, luz y salinidad sobre la germinación. Se muestra el ANOVA multifactorial para el porcentaje de germinación a los 30 días, considerando los factores especie, temperatura, luz y salinidad

Factor	SC	gl	F
Especie (Sp)	2.584,8	2	38,5
Temperatura (T)	70.892,6	5	426,2
Luz (L)	67.357,4	1	2.024,8
Salinidad (S)	298.250,0	4	2.241,3
Sp × T	38.664,5	10	116,2
Sp × L	41.375,2	2	621,9
Sp × S	87.489,2	8	328,7
T × L	12.978,0	5	78,0
T × S	44.730,4	20	67,2
L × S	19.868,8	4	149,3
Sp × T × L	29.853,8	10	89,7
Sp × T × S	32.506,8	40	24,4
Sp × L × S	17.791,6	8	66,8
T × L × S	5.788,6	20	8,7
Sp × T × L × S	12.040,6	40	301,0

SC: suma de cuadrados. gl: grados de libertad del numerador (gl del denominador: 540). En todos los casos, los factores e interacciones resultaron altamente significativos ($p < 0,001$).

nal en función de la especie, temperatura, luz y salinidad. En las tres especies analizadas los porcentajes de germinación más altos se han obtenido en los en-

sayos realizados con agua destilada, decreciendo dichos porcentajes con el aumento de la concentración salina (Figuras 1 y 2). En todos los casos se ha superado el 68% de germinación en semillas evaluadas en agua destilada en condiciones de fotoperiodo a las temperaturas de 20-7, 25-10, 28-14 y 32-18 °C, porcentaje superado también en semillas de *S. auricula* y *L. cardamine* evaluadas en las mismas condiciones a 15-4 °C. *A. macrostachyum* ha sido la especie que mejor ha soportado dosis elevadas de salinidad, obteniéndose porcentajes de germinación del $57 \pm 10\%$ y $54 \pm 13\%$ en semillas evaluadas a 20-7 y 25-10 °C, respectivamente, en condiciones de fotoperiodo y con una concentración salina de 2% de NaCl. En *S. auricula* y *L. cardamine* la germinación a concentraciones de NaCl superiores al 1% ha sido prácticamente nula. El efecto negativo del incremento de la concentración salina sobre la germinación fue más pronunciado en semillas incubadas en oscuridad para *L. cardamine* y en semillas incubadas con fotoperiodo para *S. auricula*. Dicho efecto se ha manifestado primero en las semillas evaluadas a temperaturas más altas (28-14 y 32-18 °C) y posteriormente se ha extendido a semillas evaluadas a temperaturas más bajas según ha ido aumentando la concentración. Así, en *S. auricula* y *L. cardamine* la

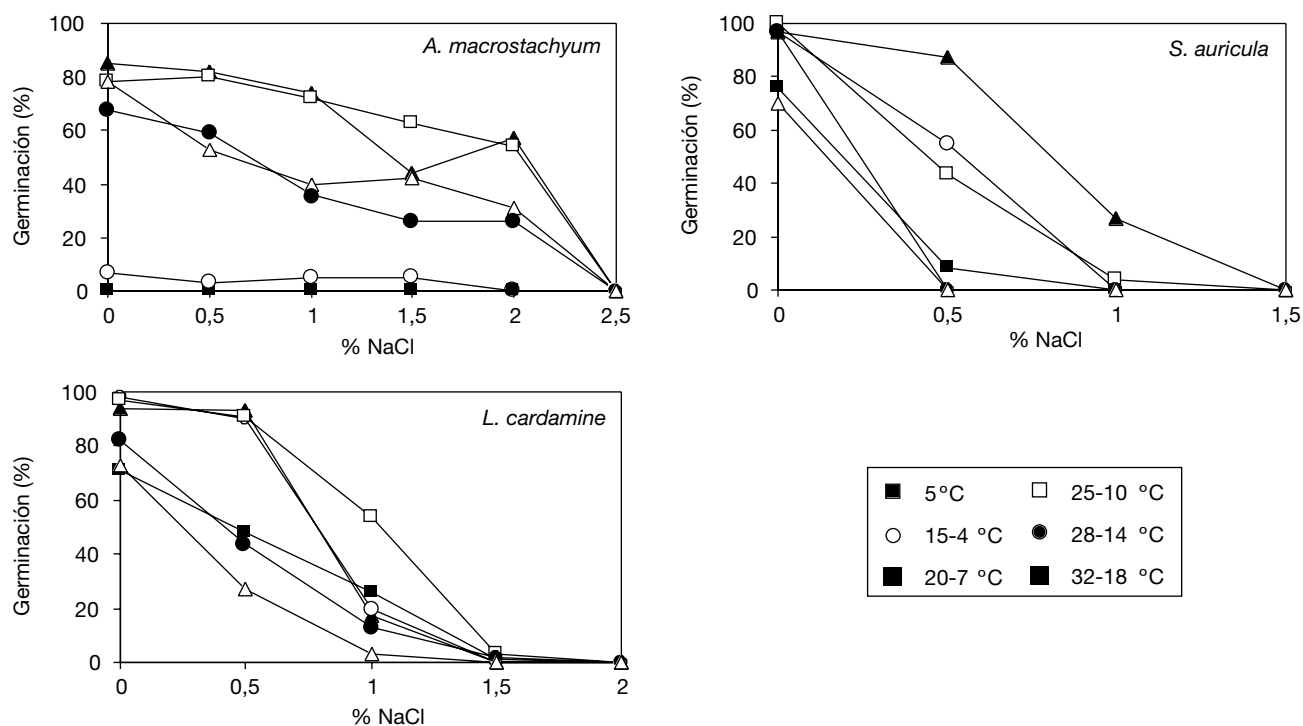


Figura 1. Porcentaje de germinación a los 30 días de *Arthrocnemum macrostachyum*, *Senecio auricula* y *Lepidium cardamine*, con 12 horas de fotoperiodo, a diferentes temperaturas en función de la concentración salina. En los tres táxones, el porcentaje de germinación al final de la experiencia fue nulo a concentraciones salinas superiores a las reflejadas en el gráfico correspondiente.

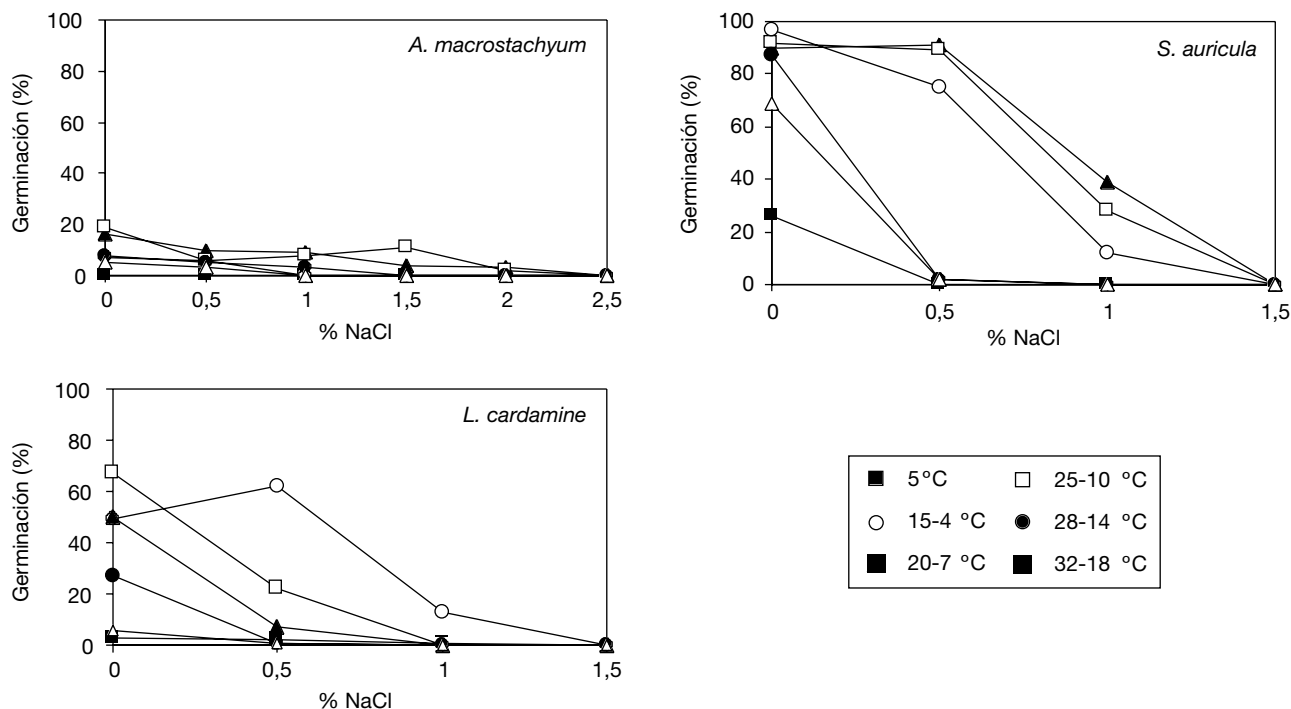


Figura 2. Porcentaje de germinación a los 30 días de *Arthrocnemum macrostachyum*, *Senecio auricula* y *Lepidium cardamine*, en condiciones de oscuridad, a diferentes temperaturas en función de la concentración salina. En los tres táxones, el porcentaje de germinación al final de la experiencia fue nulo a concentraciones salinas superiores a las reflejadas en el gráfico correspondiente.

concentración de NaCl al 0,5% ha reducido significativamente la germinación a 28-14 y 32-18 °C, pero lo ha hecho en menor medida a 15-4 y 20-7 °C, temperaturas en las que sólo se ha logrado un descenso significativo del porcentaje de germinación con NaCl al 1%. En *A. macrostachyum* sucede algo parecido: con NaCl al 1% se reduce el porcentaje de germinación a 28-14 y 32-18 °C, pero no a 20-7 y 25-10 °C, siendo preciso incrementar la dosis de NaCl hasta un 1,5% para que se produzca un descenso significativo de la germinación a la últimas temperaturas citadas.

Tanto en *A. macrostachyum* como en *L. cardamine* se han obtenido porcentajes de germinación significativamente más altos en luz que en oscuridad en todas las temperaturas ensayadas, excepto a 5 y 15-4 °C para *A. macrostachyum*, en las que la germinación siempre fue nula o muy baja, respectivamente. En *S. auricula* apenas se han detectado diferencias en los porcentajes de germinación en función de las condiciones de iluminación, salvo a 5 °C, temperatura con la que se han obtenido valores más altos con condiciones de fotoperiodo (Figuras 1 y 2).

Asimismo, en las 3 especies estudiadas ha disminuido la velocidad de germinación con el incremento de la concentración salina (Figura 3), aumentando con-

siderablemente el parámetro t_{50} en todas las temperaturas ensayadas. Así, en semillas de *A. macrostachyum* testadas a 20-7, 25-10, 28-14 y 32-18 °C en condiciones de fotoperiodo, los valores del parámetro t_{50} expresado en días son $10,5 \pm 0,86$, 10 ± 0 , 6 ± 0 y 6 ± 0 , respectivamente, sin NaCl (agua destilada), aumentando hasta $18,75 \pm 1,29$, $15,5 \pm 0,86$, $10,5 \pm 0,86$ y 11 ± 1 , respectivamente, con un 2% de NaCl (diferencias significativas en todos los casos). En *S. auricula* y *L. cardamine* se producen incrementos similares en el índice t_{50} . Cuando las semillas se han incubado en agua destilada, la velocidad de germinación ha sido más alta a temperaturas elevadas (28-14 y 32-18 °C) en el caso de *A. macrostachyum* y *L. cardamine* y a temperaturas bajas e intermedias (15-4, 20-7 y 25-10 °C) para *S. auricula* (Figura 3).

Efecto de la exposición a soluciones hipersalinas

La Tabla 2 muestra los valores obtenidos en los ANOVAs bifactoriales de la germinación final y la velocidad de germinación para cada una de las especies según el tratamiento de hipersalinidad y la temperatu-

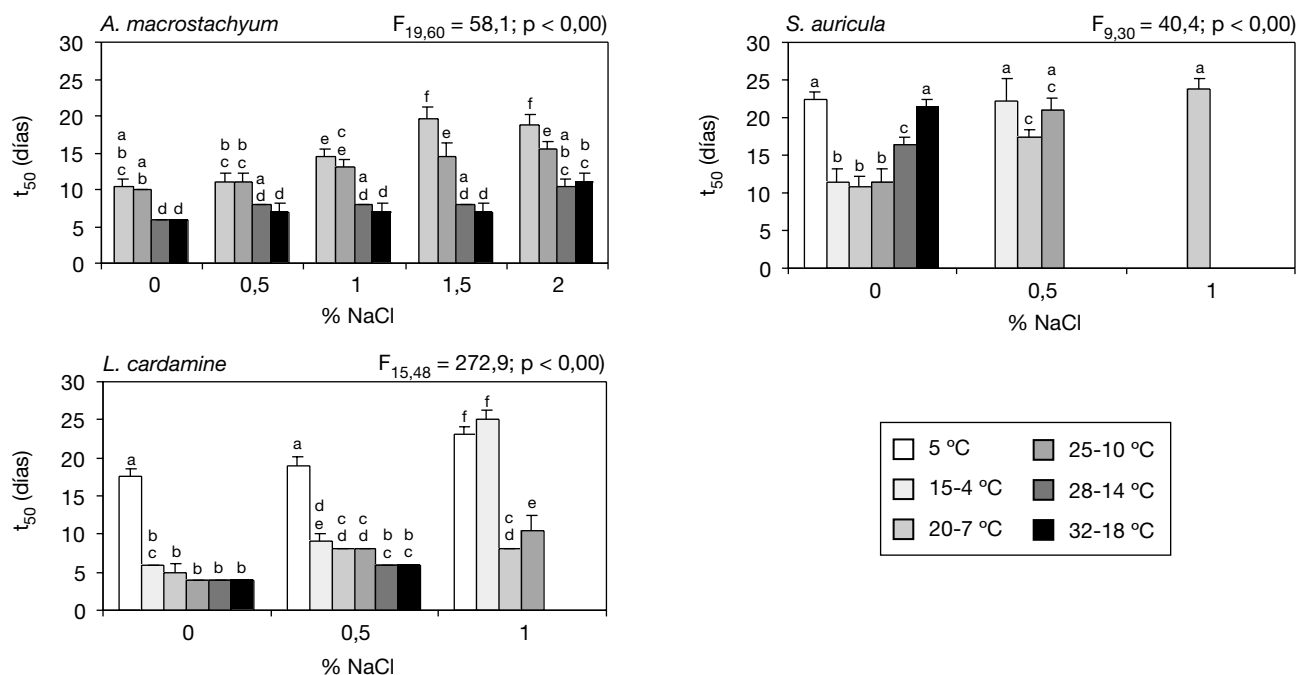


Figura 3. Velocidad de germinación (evaluada por el parámetro t_{50} expresado en días) de *Arthrocnemum macrostachyum*, *Senecio auricula* y *Lepidium cardamine*, con 12 horas de fotoperiodo, a diferentes temperaturas en función de la concentración salina. Se excluyen del análisis los tratamientos con un porcentaje final de germinación inferior al 8%. Se muestra para cada especie el F ratio del ANOVA simple resultante de comparar tratamientos entre sí. Las diferencias significativas entre tratamientos se expresan mediante letras diferentes.

ra de incubación. *A. macrostachyum* fue la especie que mejor soportó la exposición a soluciones hipersalinas, incluso durante periodos de 6 meses, obteniéndose porcentajes de germinación similares a los logrados con semillas control (no expuestas a soluciones hipersalinas) en los ensayos realizados a las temperaturas de 20-7 y 28-14 °C, y significativamente superiores a los obtenidos con semillas control en el ensayo realizado a 15-4 °C, siendo más efectiva la exposición a 4% de NaCl que la de 8% (Tabla 3). En *S. auricula* y *L. cardamine* la exposición a soluciones hipersalinas no produjo, en ninguna de las temperaturas probadas, incremento de la germinación en relación con las semillas control, siendo muy similares los porcentajes de germinación logrados, si bien la mayoría de las semillas de estas dos especies no germinaron cuando fueron expuestas a concentraciones salinas de 8% de NaCl durante 6 meses (Tabla 3). En *A. macrostachyum* y *S. auricula* la exposición durante 6 meses a soluciones de NaCl al 4% y posterior transferencia a agua destilada determinó un aumento de la velocidad de germinación (disminución del parámetro t_{50}) en relación con las semillas control, no ocurriendo lo mismo con *L. cardamine* (Figura 4). Asimismo, en *A. macrostachyum* au-

mentó la velocidad de germinación tras exposición de sus semillas al resto de tratamientos hipersalinos, fenómeno también observado en semillas de *S. auricula* incubadas a 28-14°C tras un mes de exposición a tratamiento hipersalino (datos no mostrados).

Discusión

El efecto negativo del incremento de la concentración salina sobre la germinación para las tres especies analizadas, así como la reducción de la germinación en condiciones de oscuridad mostrada por *A. macrostachyum* y *L. cardamine*, tiene un claro significado ecológico en hábitats salobres, dado que la presencia de condiciones hipersalinas en el sustrato durante los meses estivales, determinadas por el mayor poder evaporativo del aire cálido, y/o el enterramiento de las semillas por movimientos de arena o actividad de la fauna, puede dar lugar a que estos ambientes sean inapropiados temporalmente para la germinación y normal desarrollo de las plántulas, como han puesto de manifiesto Ungar (1977), Khan y Ungar (1997) y Khan y Gulzar (2003). Sin embargo, la recuperación

Tabla 2. Ensayo de soluciones hipersalinas. Se muestra los ANOVAs bifactoriales para el porcentaje de germinación final y para la velocidad de germinación (t_{50}), respectivamente

Factor	SC	gl	F
<i>A. macrostachyum</i>			
— Germinación			
• Tratamiento (Trat)	5.227,7	4	27,6***
• Temperatura (T)	18.662,9	2	196,9***
• T × Trat	11.177,1	8	29,5***
— T_{50}			
• Trat	540,2	4	379,9***
• T	602,5	2	206,7***
• T × Trat	588,1	8	206,7***
<i>S. auricula</i>			
— Germinación			
• Trat	51.774,4	4	144,0***
• T	59,2	2	0,3 n.s.
• T × Trat	2.036,8	8	2,8*
— T_{50}			
• Trat	2.075,3	4	671,8***
• T	1.315,4	2	851,7***
• T × Trat	474,7	8	76,8***
<i>L. cardamine</i>			
— Germinación			
• Trat	60.025,1	4	327,1***
• T	1.475,7	2	16,1***
• T × Trat	718,9	8	1,9 n.s.
— T_{50}			
• Trat	811,6	4	294,5***
• T	1.351,6	2	981,0***
• T × Trat	340,4	8	61,7***

Grados de libertad del denominador: 45. Otros símbolos como en la Tabla 1.

del poder germinativo en las tres especies estudiadas cuando sus semillas son transferidas desde condiciones hipersalinas (NaCl al 4% durante 6 meses) a agua destilada, indica que se trata de una inhibición reversible de naturaleza osmótica (Ungar, 1982; Woodell, 1985; Keiffer y Ungar, 1997) y que las semillas tendrán potencialidad para germinar en su hábitat natural cuando disminuya la salinidad del sustrato, fenómeno que, en ambientes mediterráneos, viene determinado habitualmente por las lluvias otoñales e invernales. Ambas estaciones son propicias para que tenga lugar una combinación óptima de condiciones de temperatura, iluminación y salinidad que favorezca la germinación. De hecho, las tres especies analizadas en este trabajo presentan una elevada capacidad germinativa con salinidades bajas (<0,5% NaCl), a las temperaturas de 20-7 y 15-4°C, si bien *A. macros-*

tachyum sólo germina por encima del 50% a esta última temperatura si sus semillas han estado expuestas previamente a soluciones hipersalinas.

Boorman (1968) y Woodell (1985) han establecido una clasificación de halófitos en función de la respuesta germinativa a dosis crecientes de salinidad y tras la exposición a soluciones hipersalinas seguida de incubación en agua destilada. En los tipos 1 y 2 la germinación es inhibida incluso a bajas salinidades, pero tras un pretratamiento con soluciones hipersalinas en el tipo 1 no se recuperan los niveles habituales de germinación en agua destilada, mientras que en el tipo 2 sí lo hacen. El tipo 3 se caracteriza por el mantenimiento de la capacidad para germinar a salinidades elevadas y porque su porcentaje de germinación se ve incrementado a determinadas temperaturas después de un pretratamiento con soluciones hipersalinas. Según dicha clasificación, *S. auricula* y *L. cardamine* serían adscribibles al tipo 2 y *A. macrostachyum* se puede asimilar al tipo 3. Los halófitos del tipo 2 son característicos de zonas inundadas ocasionalmente, mientras que los del tipo 3 habitan en zonas salinas sometidas a largos períodos de inundación, como ocurre con las depresiones del saladar de Cordovilla colonizadas por *A. macrostachyum*.

La mayor inhibición de la germinación con el incremento de la salinidad (Figuras 1 y 2) para semillas de *L. cardamine* en oscuridad, en relación a las incubadas con fotoperiodo, ha sido observada también en otros halófitos como *Haloxylon recurvum* (Moq.) Bunge ex Boiss., *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. y *Atriplex griffithii* Moq. al aumentar la salinidad de 0 a 1% de NaCl (Khan y Ungar, 1997). Asimismo, el mayor efecto inhibitorio de la germinación provocado por la salinidad en las semillas de las tres especies estudiadas evaluadas a temperaturas más altas ha sido citado también para *Suaeda fruticosa* (Khan y Ungar, 1997) y *Hordeum jubatum* L. (Badger y Ungar, 1989). Algo similar ocurre en *Beta vulgaris* L. (Francois y Goodin, 1972) así como en varias quenopodiáceas de los géneros *Atriplex* y *Salicornia* citadas en la revisión de Ungar (1978).

Los modelos de velocidad de germinación obtenidos en este trabajo difieren para las tres especies analizadas (Figura 3). En un trabajo previo con endemismos ibéricos (Herranz et al., 2002) hemos obtenido un patrón similar, habiendo especies como *Sideritis serrata* Lag. que presentan mayor velocidad de germinación a temperaturas altas, otras como *Sisymbrium arundanum* Boiss. a temperaturas intermedias y algu-

Tabla 3. Porcentaje medio de germinación (\pm desviación típica) de semillas de *Arthrocnemum macrostachyum*, *Senecio auricula* y *Lepidium cardamine* incubadas a diferentes temperaturas (agua destilada con 12 horas de fotoperiodo) en función del tiempo de exposición previo a soluciones hipersalinas de distinta concentración. Control: ensayos en las mismas condiciones con semillas almacenadas en seco hasta ese instante. Dentro de cada especie y cada temperatura de incubación (filas), letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Tukey)

Temperatura de incubación	4% NaCl		8% NaCl		Control
	1 mes	6meses	1 mes	meses	
<i>A. macrostachyum</i>					
15-4 °C	58 ± 9a	82 ± 5b	11 ± 7c	51 ± 8a	11 ± 3c
20-7 °C	78 ± 8a	85 ± 7a	84 ± 3a	81 ± 9a	86 ± 4a
28-14 °C	86 ± 9a	70 ± 2b	77 ± 10ab	80 ± 5ab	69 ± 6b
<i>S. auricula</i>					
5 °C	86 ± 5a	58 ± 10b	56 ± 7b	4 ± 3c	75 ± 5a
20-7 °C	80 ± 15a	53 ± 10b	45 ± 10b	7 ± 7c	95 ± 3a
28-14 °C	73 ± 7a	65 ± 9a	52 ± 21b	3 ± 4c	97 ± 1d
<i>L. cardamine</i>					
5 °C	84 ± 7a	56 ± 8b	67 ± 5b	0 ± 0c	74 ± 9a
20-7 °C	98 ± 4a	68 ± 5b	78 ± 5b	4 ± 0c	92 ± 3a
28-14 °C	88 ± 11a	63 ± 7b	87 ± 7a	3 ± 3c	82 ± 8a

nas como *Andryala agardhii* Haens. ex DC. con óptimos en un amplio intervalo de temperaturas. Tales patrones podrían venir determinados genéticamente y mantenerse constantes para cada especie en años con

diferentes condiciones climáticas, lo que requiere otros estudios.

El incremento en la velocidad de germinación detectado en *A. macrostachyum* y *S. auricula* tras un pre-

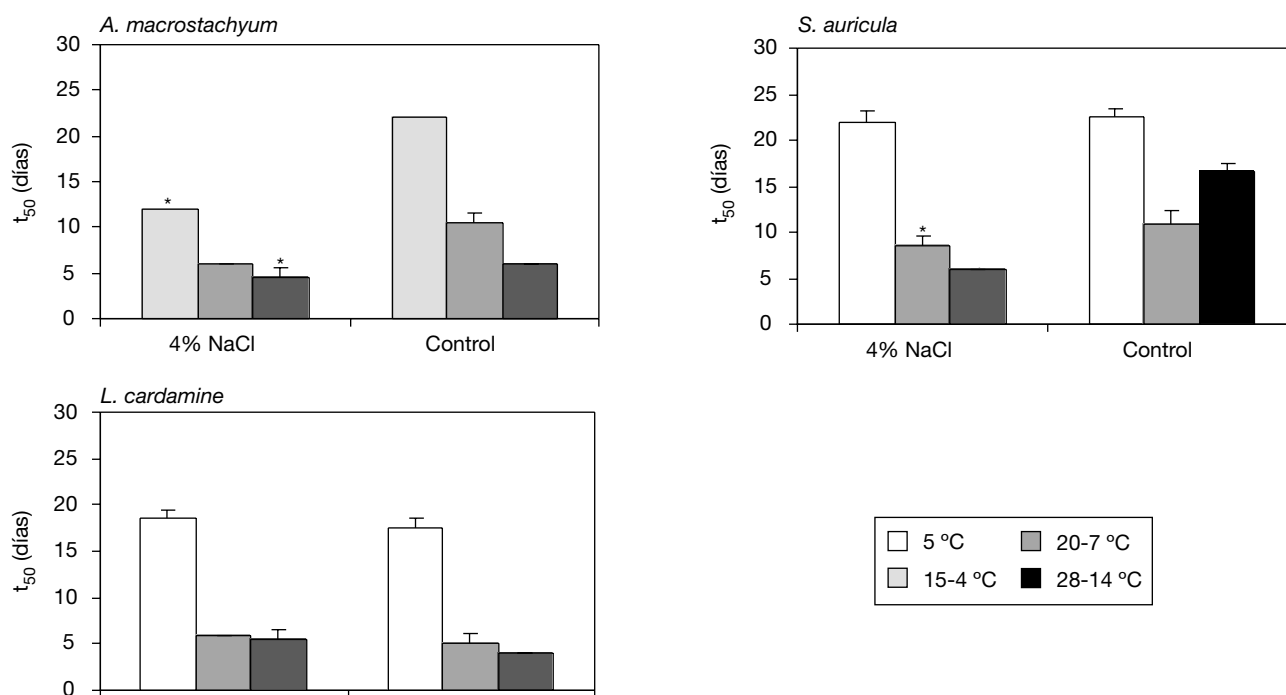


Figura 4. Velocidad de germinación (evaluada por el parámetro t_{50} expresado en días) en semillas de *Arthrocnemum macrostachyum*, *Senecio auricula* y *Lepidium cardamine* incubadas en agua destilada tras exposición durante 6 meses a una solución de 4% NaCl, así como en semillas no expuestas a soluciones hipersalinas (control). El asterisco sobre una columna indica la existencia de diferencias significativas entre el tratamiento de hipersalinidad y el control a esa temperatura.

tratamiento con soluciones hipersalinas (Figura 4) podría tener consecuencias ecológicas favorables para estas especies al permitirles germinar antes que sus especies asociadas y competir con ventaja con éstas. Como indica Hendrix (1984), las plántulas que emergen primero tienen más probabilidades de supervivencia al ser mayores los recursos disponibles. Tratamientos de este tipo deberían de tenerse en cuenta a la hora de poner en marcha programas de reforzamiento y reintroducción de poblaciones de estas especies.

Las especies *A. macrostachyum* y *L. cardamine* han germinado mejor a la luz que en oscuridad. Es probable que la mayor proporción de radiaciones en la región roja del espectro de la fuente de luz utilizada transforme el fitocromo en la forma metabólicamente activa, como ocurre en otras especies fotosensibles (Pons, 1986; Van Tooren y Pons, 1988). Otros halófitos, como *Aeluropus lagopoides* (Linn.) Trin. y *Sporolobus ioclados* (Nees ex Trin.) Nees, también germinaron mejor con luz (Khan y Gulzar, 2003). Khan y Ungar (1997) han planteado la hipótesis de que el requerimiento de luz para germinar de algunos halófitos, como *Triglochin maritima* L., puede ser una estrategia ecológica para sobrevivir en entornos muy competitivos, al evitar la germinación en formaciones vegetales densas donde las plantas adultas podrían sombrear y ahogar a las plántulas recién emergidas. Sin embargo, la estimulación de la germinación de los halófitos por la luz no es una regla general y, así, Thanos *et al.* (1991) indican que la luz inhibió parcialmente la germinación de varios halófitos de arenales costeros mediterráneos como *Brassica tournefortii* Gouan, *Cakile maritima* Scop., *Allium staticiforme* Sibth. & Sm. y *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns & Link. Asimismo, Baskin y Baskin (1995) han encontrado que de 41 especies halófitas estudiadas, la luz promovía la germinación en 20 y la oscuridad en 10, mientras que 11 especies germinaban bien tanto en luz como en oscuridad.

De los resultados obtenidos en este trabajo se deduce una clara interacción entre los efectos del régimen térmico, iluminación y niveles de salinidad sobre la germinación de los tres halófitos estudiados. En el futuro son precisos estudios adicionales sobre estas especies, unos para evaluar la formación de bancos edáficos de semillas de carácter persistente y otros para determinar en qué medida los resultados obtenidos en estos estudios de laboratorio se corresponden siempre con modelos de germinación en sus hábitats naturales.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el marco del desarrollo del proyecto «Planes de recuperación de especies vegetales amenazadas de Castilla-La Mancha y protección de hábitats naturales de interés comunitario», financiado por la Dirección General del Medio Natural (Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha), el proyecto PBI-03-013 («Ecología de la germinación y de los bancos de semillas del suelo de 15 especies vegetales amenazadas en Castilla-La Mancha») financiado por la Consejería de Ciencia y Tecnología de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, y el proyecto REN 2000-516/GLO, financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología. Los autores desean también mostrar su agradecimiento a los dos revisores anónimos cuyas sugerencias han contribuido a mejorar el trabajo.

Referencias bibliográficas

- BADGER K.S., UNGAR I.A., 1989. The effects of salinity and temperature on the germination of the inland halophyte *Hordeum jubatum*. Can J Bot 67, 1420-1425.
- BADGER K.S., UNGAR I.A., 1994. Seed bank dynamics in an inland salt marsh, with special emphasis on the halophyte *Hordeum jubatum* L. Int J Plant Sci 155 (1), 66-72.
- BASKIN C.C., BASKIN J.M., 1995. Dormancy types and dormancy-breaking and germination requirements in seeds of halophytes. En: Biology of salt tolerant plants. Khan M.A., Ungar I.A., ed. University of Karachi, Pakistan, pp. 23-30.
- BASKIN J.M., BASKIN C.C., 1998. Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego, 666 pp.
- BOORMAN L.A., 1968. Some aspects of the reproductive biology of *Limonium vulgare* Mill. and *Limonium humile* Mill. Ann Bot 32, 803-824.
- DE VILLIERS A.I., VAN ROOYEN M.W., THERON G.K., VAN DE VENTER H.A., 1994. Germination of three Namaqualand pioneer species as influenced by salinity, temperature and light. Seed Sci Technol 22, 427-433.
- ELÍAS F., RUIZ L., 1981. Estudio agroclimático de la región de Castilla-La Mancha. Conserjería de Agricultura, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Toledo, 247 pp.
- FRANCOIS L.E., GOODIN J.R., 1972. Interaction of temperature and salinity on sugar beet germination. Agron J 64, 272-273.
- HENDRIX S.D., 1984. Variation in seed weight and its effects on germination in *Pastinaca sativa* L. (Umbelliferae). Am J Bot 71, 795-802.

- HERRANZ J.M., FERRANDIS P., COPETE M.A., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ J.J., 2002. Influencia de la temperatura de incubación sobre la germinación de 23 endemismos vegetales ibéricos o iberoafricanos. *Inv Agr Prod Prot Veg* 17(2), 229-245.
- HOULE G., MOREL L., REYNOLDS C.E., SIEGEL J., 2001. The effect of salinity on different developmental stages of an endemic annual plant, *Aster laurentianus* (Asteraceae). *Am J Bot* 88 (1), 62-67.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 1985. International rules for seed testing. Annexes 1985. *Seed Sci Technol* 13, 356-513.
- KEIFFER C.H., UNGAR I.A., 1997. The effect of extended exposure to hypersaline conditions on the germination of five inland halophyte species. *Am J Bot* 84 (1), 104-111.
- KHAN M.A., GULZAR S., 2003. Light, salinity, and temperature effects on the seed germination of perennial grasses. *Am J Bot* 90, 131-134.
- KHAN M.A., UNGAR I.A., 1997. Effects of light, salinity and thermoperiod on the seed germination of halophytes. *Can J Bot* 75, 835-841.
- KHAN M.A., UNGAR I.A., 2001. Alleviation of salinity stress and the response to temperature in two seed morphs of *Halopyrum mucronatum* (Poaceae). *Aust J Bot* 49, 777-783.
- LENTZ K.A., JOHNSON H.A., 1998. Factor affecting germination of endangered northeastern bulrush, *Scirpus ancistrochaetus* Schuyler (Cyperaceae). *Seed Sci Technol* 26, 733-741.
- POLJAKOFF-MAYBER A., SOMERS G.F., WERKER E., GALLAGHER J.L., 1994. Seeds of *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae): their structure, germination, and salt tolerance. II. Germination and salt tolerance. *Am J Bot* 81, 54-59.
- PONS T.L., 1986. Response of *Plantago major* seeds to the red/far red ratio as influenced by other environmental factors. *Physiol Plantarum* 68, 252-258.
- RIVAS-MARTÍNEZ S., DÍAZ T.E., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ F., IZCO J., LOIDI J., LOUSA M., PENAS A., 2002. Vascular plant communities of Spain and Portugal. *Itinera Geobotanica* 15(2), 433-922.
- SCHÜTZ W., MILBERG P., LAMONT B.B., 2002. Seed dormancy, after-ripening and light requirements of four annual Asteraceae in South-western Australia. *Ann Bot* 90, 707-714.
- THANOS C.A., GEORGHIOU K., DOUMA D.J., MARANGAKI C.J., 1991. Photoinhibition of seed germination in Mediterranean maritime plants. *Ann Bot* 68, 469-475.
- THANOS C.A., GEORGHIOU K., 1988. Ecophysiology of fire-stimulated seed germination in *Cistus incanus* subsp. *creticus* (L.) Heywood and *C. salvifolius* L. *Plant Cell Envir* 11, 841-849.
- TUKEY J.W., 1949. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 5, 99-114.
- UNGAR I.A., 1977. Salinity, temperature, and growth regulator effects on seed germination of *Salicornia europaea* L. *Aquat Bot* 3, 329-335.
- UNGAR I.A., 1978. Halophyte seed germination. *Bot Rev* 44(2), 233-264.
- UNGAR I.A., 1982. Germination ecology of halophytes. En: Contributions to the ecology of halophytes. Sen D.N., Rajpurchit K.S., ed. Junk, The Hague, pp. 143-154.
- UNGAR I.A., 1996. Effect of salinity on seed germination, growth, and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae). *Am J Bot* 83, 604-607.
- VAN TOOREN B.F., PONS T.L., 1988. Effects of temperature and light on the germination in chalk grassland species. *Funct Ecol* 2, 303-310.
- VV.AA., 2000. Lista roja de flora vascular española. *Conserv Veg* 6, 11-38.
- WOODELL S.R.J., 1985. Salinity and seed germination patterns in coastal plants. *Vegetatio* 61, 223-229.